

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig - Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. Th. Schliesser

**Untersuchungen über die serologische Differenzierung
von Schweine - Mykoplasmen mit Hilfe der Latex - Agglutination**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig - Universität zu Gießen

Eingereicht von
Elke Heun
Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 1973

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig - Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. Th. Schliesser

**Untersuchungen über die serologische Differenzierung
von Schweine - Mykoplasmen mit Hilfe der Latex - Agglutination**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig - Universität zu Gießen

Eingereicht von
Elke Heun
Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 1973

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin zu Gießen

Dekan: Professor Dr. E. Weiss

Berichterstatter: Professor Dr. Th. Schliesser

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juni 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM, VERSUCHE ZUR SEROLOGISCHEN IDENTIFIZIERUNG VON SCHWEINEMYKOPLASMEN	2
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	6
3.1 Material und Methoden	6
3.1.1 Antigengewinnung	6
3.1.1.1 Nährmedium	6
3.1.1.2 Mykoplasmen-Stämme	7
3.1.1.3 Anzüchtungsmodus	8
3.1.1.4 Herstellung des Antigens	8
3.1.1.5 Aufbereitung des Antigens für den Latextest	8
3.1.2 Herstellung von Antiserum	9
3.1.2.1 Aufbereitung des Antigens zur Injektion	9
3.1.2.2 Impfmodus und Serumgewinnung	9
3.1.2.3 Serumabsorption an Nährmedium	10
3.1.3 Latexagglutination	10
3.1.3.1 Puffer	10
3.1.3.2 Ausführung des Latextestes	10
3.1.3.3 Ablesung und Beurteilung der Latexagglutination	12
3.1.3.4 Kontrollen zur Absicherung des Latextestes	13
3.2 Untersuchungsergebnisse	16
3.2.1 Antiserum gegen M.suipneumoniae (Kaninchen Nr. 7)	16
3.2.2 Antiserum gegen M.hyopneumoniae (Kaninchen Nr. 3 und 4)	20
3.2.3 Antiserum gegen M.hyorhina (Kaninchen Nr. 1 und 2)	23

3.2.4 Antiserum gegen E ₉ (Kaninchen Nr. 5 und 6)	28
3.2.5 Antiserum gegen M.granularum (Kaninchen Nr. 9 und 10)	33
4. DISKUSSION	38
5. ZUSAMMENFASSUNG	43
6. LITERATURVERZEICHNIS	44

1. EINLEITUNG

Mykoplasmen konnten bisher bei verschiedenen Erkrankungen von Schweinen isoliert werden. Zu diesen Krankheiten zählen vor allem die für die Schweinemast wirtschaftlich so bedeutungsvolle Enzootische Pneumonie, ferner die Polyserositis sowie die Rhinitis atrophicans. Trotzdem schon viele experimentelle Untersuchungen mit beim Schwein isolierten Mykoplasmenstämmen durchgeführt wurden, sind hinsichtlich Pathogenität und Bedeutung für das Zustandekommen dieser Erkrankungen immer noch Fragen offen. Dies liegt zum Teil mit an den besonderen biologischen Eigenschaften der Mykoplasmen und ihrer oft schwachen und wechselnden Antigenität, woraus sich vor allem in diagnostischer Hinsicht Schwierigkeiten ergeben.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob sich möglicherweise die sehr empfindliche Latexagglutination für die serologische Differenzierung von Schweinemykoplasmen eignet.

2. SCHRIFTTUM,

VERSUCHE ZUR SEROLOGISCHEN IDENTIFIZIERUNG VON SCHWEINEMYKOPLASMEN

Erste Berichte über serologische Untersuchungen Schweinemykoplasmen erfolgten durch ROSS und SWITZER (1963). Sie untersuchten 17 Mykoplasmaisolate mit Hilfe des indirekten Hämagglutinationstestes unter Verwendung von Hyperimmunseren von Ratten, Kaninchen und Schweinen. Die untersuchten Isolate ließen sich serologisch in zwei Gruppen aufteilen, was auch ihren Eigenschaften bezüglich Wachstum, Stoffwechsel und Pathogenität entsprach.

DINTER et al. (1965) untersuchten mittels der Agargelpräzipitation und des Wachstumshemmungstestes 12 vom Schwein isolierte Mykoplasmastämme, und zwar 2 *M.hyorhinis* Stämme, 3 SEP-Stämme, 1 *M.granularum* Stamm und 6 B-Stämme. Sie konnten zwischen den SEP- und *M.hyorhinis*-Stämmen eine stärkere serologische Beziehung ermitteln. Die anderen untersuchten Stämme ließen sich in 5 verschiedene Serotypen aufgliedern. *M.granularum* wies keinerlei serologische Verwandtschaft mit den anderen Stämmen auf.

GOODWIN et al. (1967) prüften die serologischen Beziehungen von *M.suipneumoniae* zu verschiedenen anderen bei Schweinen auftretenden Mykoplasmaspezies. Als serologische Methoden verwendeten sie dazu den Wachstums- sowie Stoffwechselhemmungstest, die Agargelpräzipitation und die direkte Immunofluoreszenz. *M.suipneumoniae* und *M.hypopneumoniae* waren im Stoffwechsel- und Wachstumshemmungstest nicht zu unterscheiden, woraus auf eine enge serologische Verwandtschaft oder sogar mögliche Identität geschlossen wurde. Gegenüber den anderen untersuchten Stämmen wie *M.hyorhinis* und *M.granularum* traten keine Kreuzreaktionen mit *M.suipneumoniae* auf.

ROBINSON, MOORE UND REDMOND (1967) infizierten Hampshire- und Yorkshire-Schweine mit einer neuen Mykoplasmaspezies und

untersuchten dann deren Seren vergleichend in einem Platten- und einem Röhrchentest in der indirekten Hämmagglutination. 9 Tage nach der Inokulation konnten sie von 0 - 1:640 variierende Titer feststellen. Sie gaben dem Plattentest gegenüber dem Röhrchentest den Vorzug, da ersterer eindeutiger positive Reaktionen lieferte und nur eine relativ kurze Inkubationszeit benötigte.

SCHIMMEL und HUBRIG (1968) führten mit Hilfe der Agargel-präzipitation, der Objektträger- sowie Langsamagglutination und des Stoffwechselhemmungstestes Untersuchungen mit verschiedenen Schweinemykoplasmastämmen durch. Auf Grund der übereinstimmenden Ergebnisse aus den verschiedenen Methoden stellten sie ein serologisches Schema auf, das 5 Serotypen umfaßte.

Mittels der direkten und indirekten Immunofluoreszenz und des Wachstumshemmungstestes untersuchten TULLY und RAZIN (1968) vergleichend die Stämme *M.granularum*, *M.laidlawii* und *M.hyorhinae*. Bei beiden serologischen Methoden konnten minimale serologische und morphologische Ähnlichkeiten zwischen *M.granularum* und *M.laidlawii* beobachtet werden. *M.hyorhinae* dagegen wies keinerlei Kreuzreaktionen mit den 2 anderen Stämmen auf.

FUJIKURA et al. (1970) beschrieben einen Röhrchenagglutinationstest, mit dem sie Seren natürlich und experimentell infizierter Schweine gegen 2 *M.hyopneumoniae*-Stämme als Antigen untersuchten. Sie überprüften ihre erhaltenen Ergebnisse mit Hilfe der KBR. Zu *M.hyorhinae* bestanden keine Kreuzreaktionen.

GOODWIN und HODGSON (1970) vermochten mit Hilfe des Passiven Hämagglutinationstestes nach Absorption der Immunseren mit lyophilisiertem Nährmedium *M.suipneumoniae*, *M.hyorhinae* und *M.granularum* zu differenzieren. *M.hyopneumoniae* ließ sich jedoch auch hier kaum von *M.suipneumoniae* unterscheiden. Schwache Kreuzreaktionen ermittelten sie zwischen *M.hyorhinae* und *M.suipneumoniae*. Sie konnten diese Ergebnisse durch die

KBR und Agargelpräzipitation bestätigen.

LAM und SWITZER (1971) führten mit der indirekten Hämagglutination Untersuchungen mit Seren von experimentell mit *M.hypopneumoniae* infizierten und auf natürlichem Wege an SEP-erkrankten Schweinen durch. Dabei wurden keine Kreuzreaktionen von *M.hypopneumoniae* mit den Stämmen *M.granularum* und *M.hyorhinis* festgestellt. Zur Kontrolle wurden dieselben Seren mittels der KBR untersucht.

L'ECUYER und BOULANGER (1970) vermochten mit der direkten Immunofluoreszenz den Stamm *M.hypopneumoniae* auf Ausstrichen von Flüssigkulturen, in beimpften Zellkulturen sowie in Gefrierschnitten aus pneumonischem Lungengewebe experimentell und natürlich infizierter Schweine nachzuweisen. Als Antikörper verwendeten sie konjugiertes Globulin von Seren experimentell infizierter Schweine. Die Reaktionen waren spezifisch.

HODGES und BETTS (1969) untersuchten mit Hilfe der KBR sowohl Seren von experimentell mit *M.hypopneumoniae* infizierten Schweinen als auch eine große Anzahl von Serumproben aus den verschiedensten Beständen mit klinisch erkrankten sowie gesunden Tieren. Nach weniger als 2 Wochen post infectionem konnten bei künstlich infizierten Schweinen Antikörpertiter von 1:40 - 1:320 nachgewiesen werden, die mindestens 15 Wochen anhielten. Die Reaktionen der KBR zeigten zwar eine verhältnismäßig hohe Spezifität, jedoch machten die prokomplementären Eigenschaften der Schweineseren die Ermittlung von Antikörpertitern unter 1:20 unmöglich. Bei den Serumproben aus den Schweinebeständen entsprachen die erhaltenen serologischen Ergebnisse nur zum Teil den pathologischen Lungenbefunden.

ACKERMANN und HILL (1972) berichten über Untersuchungen von Seren SEP-freier Schweine und experimentell mit *M.hypopneumoniae* infizierter Tiere mittels der KBR. Bei ersteren konnte bei 2 % der Schweine ein Titer von 1:20 oder mehr beobachtet werden. In der 2. Gruppe erreichten 36 % einen Titer von 1:50 bis zu

1:200. Allerdings war es nicht möglich, Titer von 1:20 oder niedriger infolge der Ergebnisse der SEP-freien Tiere genauer zu interpretieren.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden:

3.1.1 Antigengewinnung:

3.1.1.1 Nährmedium:

Zur Anzüchtung der Mykoplasmenstämme wurde Whittlestone-Medium verwendet und folgendermaßen hergestellt:

Lösung A: 5 g Lactalbumin

400 ml Hank's Lösung (bzw. 390 ml bei Antibiotikazugabe). Das Lactalbumin wurde zur Hank's Lösung gegeben und 15 Minuten bei 1,2 atü autoklaviert.

Zusammensetzung der Hank'schen Lösung:

NaCl 8,0 g

KCl 0,4 g

MgSO₄ 7 H₂O 0,2 g

Na₂HPO₄ 2H₂O 0,12 g

KH₂PO₄ 0,06 g

NaHCO₃ 0,35 g

Aqu.dest. ad 1000 ml

Der fertigen Lösung wurden noch

0,14gCaCl₂ zugesetzt. Danach wurde sie autoklaviert.

Lösung B: 300 ml Hartley-Brühe Oxoid (Pankreas-extrakt-Herz- oder Fleischbouillon nach Douglas mod. nach Hartley)

Lösung C: 200 ml Schweineserum, zuvor 45 Min. bei 56 °C inaktiviert, 10 ml Hefeextrakt (Herstellung nach Herderschêe: 500 g Bäckerhefe in 500 ml Aqua dest. aufschlemmen und auf pH 4,5 einstellen; 20 Min. bei 80 °C inkubieren und anschließend 20 Min. bei 900 g zentrifugieren; Überstand durch Seitzfilter Nr. EKS II Größe 6 filtrieren und in 10 ml-Portionen bei - 20 °C aufbewahren). 5 ml Phenolrotlösung 0,2 %ig, 2 Mill. I.E.Penicillin Hefeextrakt, Phenolrotlösung und Penicillin werden zum Schweineserum hinzupipettiert und mit Seitzfilter Nr. EKS II Größe 14 filtriert.

Zur Fertigstellung des Mediums wurden die Lösungen B und C auf 50 °C erwärmt und zu A, das auf 50 °C abgekühlt war, hinzugefügt.

3.1.1.2 Mykoplasmen-Stämme:

Die in der folgenden Übersicht aufgeführten fünf verschiedenen Mykoplasmenstämme wurden als Antigene verwendet:

Stamm	isoliert aus	Herkunft u. Literatur
M.suipneumoniae	Ferkel mit Enzootischer Pneumonie, isoliert über Gewebekultur	GOODWIN et al.(1965)
M.hyopneumoniae	Ferkel mit Enzootischer Pneumonie	MARE et al. (1965)
M.hyorhinis	Ferkel mit Enzootischer Pneumonie und Rhinitis atrophicans	SWITZER (1965)
E ₉	Ferkel mit Enzootischer Pneumonie	HARTWICH et al. (1967)
M.granularum	Schwein mit Arthritis	SWITZER (1964)

3.1.1.3 Anzüchtungsmodus:

Lyophilisiertes Material dieser Stämme wurde in Reagenzröhrchen mit 5 ml flüssigem Whittlestone-Medium suspendiert und bei 37 °C bebrütet. Danach wurden 1 ml-Portionen dieser Röhrchenkulturen zur Vermehrung in weitere Reagenzröhrchen, die ebenfalls 5 ml Nährmedium enthielten, überimpft und erneut bebrütet.

Anschließend wurden jeweils 10 dieser Röhrchen in Fernbachkolben mit ca. 700 - 800 ml flüssigem Nährmedium überimpft. Die Bebrütungszeit der einzelnen Stämme richtete sich nach ihrem Wachstum. Für *M.hyorhinae* und *M.hypopneumoniae* war eine Bebrütungsdauer von 4-5 Tagen erforderlich, während die drei anderen Stämme 3-4 Tage benötigten.

3.1.1.4 Herstellung des Antigens:

Nach der Bebrütung wurde der Kolbeninhalt mittels Gramfärbung auf bakterielle Verunreinigung überprüft und bei negativem Ausfall anschließend in einer Servall-RC2-Zentrifuge mit einem GSA-Rotor bei 16300 g 20 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal in ca. 10 ml Aqua bidest. gewaschen, im SS34-Rotor bei 17300 g 10 Minuten zentrifugiert und danach sofort tiefgefroren. Das so aus ca. 30 Kolben je Mykoplasma Stamm gesammelte Antigen wurde gefriergetrocknet und bei - 20 °C aufbewahrt. Die Antigenausbeute aus gleichen Mengen Flüssigkultur war bei den zwei schlecht wachsenden Stämmen erheblich geringer als bei den drei gut wachsenden. Ein besonders gutes Wachstum wiesen die Stämme *M.granularum* und *E₉* auf.

3.1.1.5 Aufbereitung des Antigens für den Latextest:

Für den Latextest war eine weitere Aufbereitung des Antigens erforderlich. 100 mg des lyophilisierten Materials wurden in 5 ml phys.NaCl-Lösung suspendiert und 24 x 10 Sekunden, insgesamt 4 Min., mit Ultraschall (Branson-Sonifer 20 KS)

behandelt. Anschließend wurde dieses Antigen bei 17300 g 30 Min. zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, in kleinen Portionen zu je 0,2 ml abgefüllt und bei - 20 °C tiefgefroren.

3.1.2 Herstellung von Antiserum:

3.1.2.1 Aufbereitung des Antigens zur Injektion:

Die Antiseren wurden in Anlehnung an die Arbeiten von MORTON und ROBERTS sowie von LYNN gewonnen. Zu 1 ml kompletten Freund'schem Adjuvans (Difco 0638-60) wurden 2,2 mg lyophilisiertes Antigen gegeben und 10 Sekunden mit dem Branson-Sonifer 20 KS ultrabeschallt, um eine gleichmäßige Durchmischung des Antigens im Adjuvans zu erreichen.

3.1.2.2 Impfmodus und Serumgewinnung:

Zur Immunisierung standen etwa 2-3 kg schwere Kaninchen zur Verfügung, von denen jeweils 2 unter gleichen Bedingungen mit derselben Antigenpräparation eines Mykoplasma Stammes durch mehrmalige Injektionen immunisiert wurden. Bei der 1. Immunisierung wurden pro Kaninchen insgesamt 3 ml, entsprechend 6,6 mg Antigen, injiziert. Jedes Tier erhielt:

- je 0,1 ml in die beiden hinteren Zentralfußballen,
- je 0,5 ml i.m. an jeweils 2 Stellen beider Schultern,
- je 0,1 ml intradermal an 8 verschiedenen Stellen
des Rückens.

Die 2. Immunisierung erfolgte 3 Wochen später. Dabei wurden 2 ml (= 4,4 mg) Antigen i.m. nachgeimpft.

In der gleichen Weise und im gleichen zeitlichen Abstand erfolgte noch eine 3. und 4. Immunisierung.

Blutentnahme: Vor der 1. Immunisierung sowie jeweils eine Woche nach der 2., 3. und 4. Impfung wurde den Tieren Blut aus der Ohrvene entnommen und das Serum in der Latexagglutination getestet. Acht bis zehn Tage nach der letzten Impfung wurden

alle Kaninchen ausgeblutet, in üblicher Weise das Serum gewonnen und bis zur weiteren Bearbeitung bei - 20 °C aufbewahrt.

3.1.2.3 Serumabsorption an Nährmedium:

Um im Latextest unspezifische Reaktionen der Kaninchenantiseren mit Nährbodenbestandteilen auszuschließen, die u.U. in Spuren in den Antigenaufbereitungen der Mykoplasmen vorhanden sein können, wurde Kaninchenantiserum mit unbeimpftem, lyophilisiertem Whittlestone-Medium absorbiert. Hierzu wurden 200 mg des lyophilisierten Mediums in 1 ml Serum gegeben und zur Absorption 2 Tage bei 4 °C aufbewahrt. Danach wurde das Serum bei 1000 g 10 Min. zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, in 0,6 ml-Portionen abgefüllt und bei - 20 °C aufbewahrt.

3.1.3 Latexagglutination:

3.1.3.1 Puffer:

Anstelle des bei MORTON angegebenen unstabilen Glycinpuffers wurde Boratpuffer verwendet. Der 0,1 mol. Boratpuffer wurde folgendermaßen hergestellt: 0,62 g H_3BO_3 und 0,746 g KCl wurden in 100 ml H_2O gelöst, 11,8 ml 0,1 n NaOH hinzugegeben und die Lösung auf 200 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. Der Puffer wurde mit dem pH-Meter Hillerkus auf pH 8,20 eingestellt und anschließend autoklaviert.

3.1.3.2 Ausführung des Latextestes:

Der Latextest wurde in Glasröhrchen von 8 x 30 mm ausgeführt. Für die Latexsuspension wurde das Difco-Präparat 3102-65 mit der Teilchengröße 0,81 μm verwendet und für den Test 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt.

Die Mykoplasmen-Antigene wurden in der Gebrauchsverdünnung von 1:160 benützt. Diese Verdünnung hatte sich aus mehreren Vorversuchen und Antigenauswertungen als optimal für den Latextest ergeben. Die Gebrauchsverdünnung wurde hergestellt, indem zunächst die unter 1e beschriebenen Antigenpräparationen 1:16 mit Boratpuffer (0,05 ml Antigen + 0,75 ml Boratpuffer) verdünnt wurden. Zu 0,5 ml dieser Antigenverdünnung wurden dann 0,2 ml der Latexverdünnung 1:5 hinzugegeben. Nach einer Wartezeit von 10 Min. bei Zimmertemperatur wurden 4,3 ml Boratpuffer hinzugefügt und somit die Endverdünnung 1:160 erhalten. Nach weiteren 10 Min. war das Latex-Antigen für die Agglutination gebrauchsfertig.

Von den Antiseren wurden mit Boratpuffer Verdünnungsreihen von 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 und 1:2560 hergestellt. Je 0,3 ml des gebrauchsfertigen Latex-Antigens wurden mit je 0,3 ml jeder Verdünnungsstufe der Antiseren in Röhrchen zusammengegeben. Nach guter Durchmischung durch Schütteln wurden die Röhrchen mit Aluminiumfolie abgedeckt und bei 37 °C 20 Stunden in feuchtigkeitsgesättigter Luft aufbewahrt. Nach Herausnahme aus dem Brutschrank blieben die Röhrchen noch eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen, bevor der Test abgelesen wurde.

Zur Absicherung der Ergebnisse eines jeden Ansatzes wurden folgende Kontrollen durchgeführt:

- 1) Antigenkontrolle: Latex-Antigenverdünnung 1:160 + Puffer,
je 0,3 ml
- 2) Serumkontrolle: Serumverdünnung 1:20 + Latexverdünnung
1:125, je 0,3 ml

In den beiden Kontrollen durften keine Agglutinationen auftreten.

3.1.3.3 Ablesung und Beurteilung der Latexagglutination:

Die Ablesung und Beurteilung der Agglutination erfolgte ohne weitere Hilfsmittel.

Der Test wurde als dreifach positiv (+++) beurteilt, wenn sich am Boden des Röhrchens ein dickes, weißes Sediment gebildet hatte und die darüberstehende Flüssigkeit völlig klar war.

Das Ergebnis galt als zweifach positiv (++), wenn am Boden des Röhrchens zwar ein dichter Bodensatz bestand, aber die darüberstehende Flüssigkeit mit feinen Klümpchen durchsetzt war.

Als nur einfach positiv (+) wurden diejenigen Röhrchen beurteilt, in denen feinste Klümpchen in der Flüssigkeit schwammen und kein Bodensatz zu erkennen war.

Röhrchen, deren Inhalt milchig trübe war, galten als negativ.

Allen in den Tabellen aufgeführten Ergebnisse liegt dieses Beurteilungsschema zu Grunde. Es wurde in dieser Form aufgestellt und beibehalten, nachdem es mikroskopisch überprüft worden war. Dazu waren Proben aus Röhrchen mit unterschiedlich starken positiven Reaktionen, aus negativen Röhrchen und aus den Antigen- und Serumkontrollen folgendermaßen mikroskopisch untersucht worden:

Der Inhalt der Röhrchen wurde aufgeschüttelt, ein Tropfen davon auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mittels Ölimmersion bei 850-facher Vergrößerung untersucht. Die Serum- und Antigenkontrollen zeigten, daß hier die Latex-Partikel einzeln und gleichmäßig verstreut, höchstens ab und zu paarweise und zu dreien zusammenliegend, im Präparat vorkamen (Abb. 1). Material aus Röhrchen, das makroskopisch dreifach positiv (+++) zu bewerten war, zeigte

im Mikroskop eine starke traubenförmige Verklumpung der Latexpartikel (Abb. 2); einzelne Latexpartikel waren nur ganz selten vorhanden. Bei makroskopisch zweifach (++) positiven Röhrchen (Abb. 3) nahmen die einzeln und zu wenigen zusammenliegenden Partikel geringfügig zu, aber es waren noch zahlreiche größere Zusammenballungen der Latexkügelchen zu sehen.

Bei den einfach positiven (+) Röhrchen (Abb. 4) gingen diese Verklumpungen noch stärker zurück, und die Anzahl einzeln liegender Latexpartikel nahm entsprechend zu.

Bemerkenswert war, daß unter dem Mikroskop noch mäßige Verklumpungen der Latexpartikel in Serumverdünnungen feststellbar waren, die makroskopisch als negativ beurteilt wurden und bis zu 2 Stufen höher lagen als die makroskopisch nachweisbaren Endtiter. Allerdings war eine genaue Abgrenzung zwischen noch schwach positiven und eindeutig negativen Reaktionen in diesen Serumverdünnungen auch mikroskopisch nicht immer möglich. Von einer mikroskopischen Ablesung und Beurteilung wurde daher abgesehen. Zudem wäre auch im Vergleich zur makroskopischen Ablesung der Arbeitsaufwand erheblich größer gewesen. Die mikroskopischen Kontrolluntersuchungen zeigten jedoch andererseits, daß es sich bei den makroskopisch mit + beurteilten Reaktionen noch um eindeutige Agglutinationen handelte. Aus diesem Grunde erschien es berechtigt, solche Reaktionen als gesicherte positive Agglutinationen anzusehen.

3.1.3.4 Kontrollen zur Absicherung des Latextestes:

Zur Absicherung des Latextestes wurde den Kaninchen vor der Immunisierung Blut entnommen und auf präimmunen Titer hin untersucht. Mit Ausnahme von zwei Kaninchen wiesen alle anderen in unterschiedlicher Höhe geringe Agglutinationstiter gegen verschiedene Mykoplasmenantigene, vor allem gegen

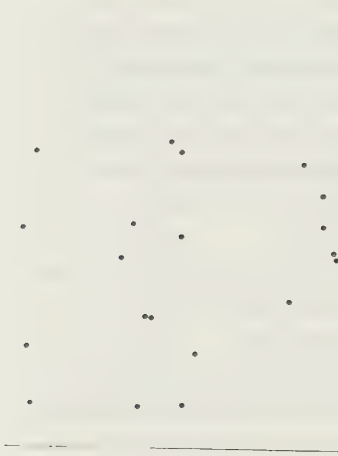


Abb. 1

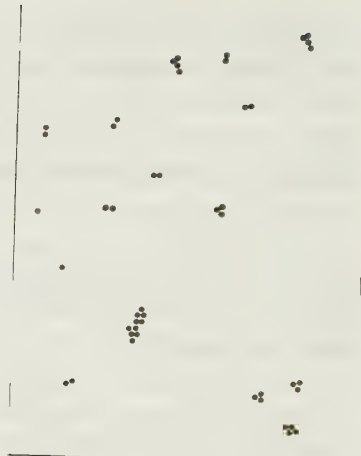


Abb. 2

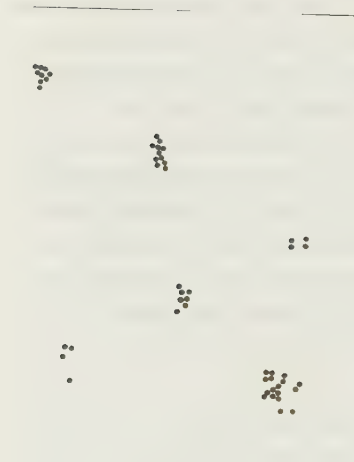


Abb. 3

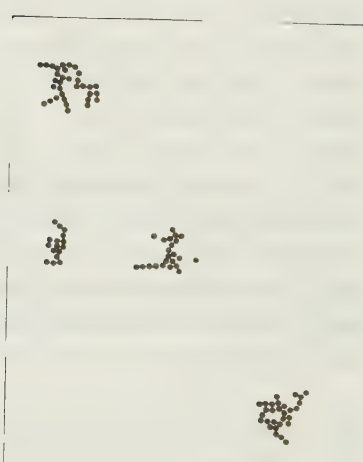


Abb. 4

- Abb. 1: Negative Latex-Agglutination
(Latex-Antigen + Boratpuffer)
Abb. 2: Positive (+) Latex-Agglutination
Abb. 3: Positive (++) Latex-Agglutination
Abb. 4: Positive (+++) Latex-Agglutination

M.hyorhinitis, auf. Sie beeinflussten jedoch die Antikörperbildung im Verlauf der Immunisierung nicht nennenswert. Die alleinige Verabreichung von komplettem Freund'schem Adjuvans an Kaninchen, die zur Kontrolle ausgeführt wurde, führte in der Latexagglutination nicht zu unspezifischen Kreuzreaktionen mit den verwendeten Mykoplasmaantigenen.

3.2 Untersuchungsergebnisse:

Es wurden Antiseren gegen 5 verschiedene Mykoplasmenstämme hergestellt und die gewonnenen Antiseren jeweils gegen den homologen Stamm und die heterologen Antigene in der Latexagglutination untersucht. Mit Ausnahme von *Mycoplasma suis pneumoniae*, wo das 2. Kaninchen während der Immunisierung interkurrent einging, wurden pro Stamm zwei Kaninchen immunisiert.

Die Ergebnisse der Latexagglutinationen werden entsprechend dem Immunisierungsverlauf und nach Stämmen getrennt in den folgenden Tabellen zusammengestellt und jeweils gesondert besprochen.

3.2.1 Antiserum gegen *M. suis pneumoniae* (Kaninchen Nr. 7):

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tab. 1 und 2 sowie der Abb. 5 aufgeführt. Eine Blutentnahme vor der Immunisierung des Kaninchens ist unterblieben. Dafür wurden spezifische Antikörpertiter 8 Tage nach der 1. Impfung ermittelt.

a) Nicht absorbierte Seren:

Gegen das homologe Antigen (*M. suis pneumoniae*) trat schon nach der 2. Impfung ein Titer von 1:320 auf, der dann nach den zwei folgenden Impfungen noch um je eine Serumverdünnungsstufe bis auf 1:1280 anstieg.

Von den heterologen Antigenen wurden mit *M. hyopneumoniae* genau gleich hohe Titerwerte wie mit *M. suis pneumoniae* erhalten.

Mit *M. hyorhinis*-Antigen lag nach der 2. und 4. Impfung der Titer eine Verdünnungsstufe niedriger als mit dem homologen *M. suis pneumoniae*-Antigen; nach der 3. Impfung war er vorübergehend sogar gleich hoch.

Das E₉-Antigen lieferte im Verlauf der Immunisierung dagegen deutlich schwächere Kreuzagglutinationen. Die Titer blieben fast durchgehend um 2 Verdünnungsstufen unter den Grenzwerten des homologen Antigens.

Das M.*granularum*-Antigen zeigte von allen heterologen Stämmen die geringste Kreuzaktivität. Bis nach der 3. Impfung konnte keine oder nur eine schwache Reaktion in der niedrigsten Titerstufe (1:20) beobachtet werden.

b) Absorbiertes Serum:

Aus Tab. 2 geht hervor, daß die Titer von M.*suipneumoniae* und M.*hyopneumoniae* nach der Absorption der Seren mit lyophilisiertem Nährmedium nur um eine Titerstufe zurückgingen. Demgegenüber sanken die Kreuztiter für das M.*hyorhinis*-Antigen und das E₉-Antigen deutlich um 3 Verdünnungsstufen ab. Die Befunde mit M.*granularum* waren nach der Absorption vollkommen negativ. Die Ergebnisse lassen eine enge antigene Beziehung, wenn nicht Identität, zwischen M.*suipneumoniae* und M.*hyopneumoniae* erkennen (vgl. Abb. 5 und 6).

Abb. 5: Endtiter nach der 4. Immunisierung

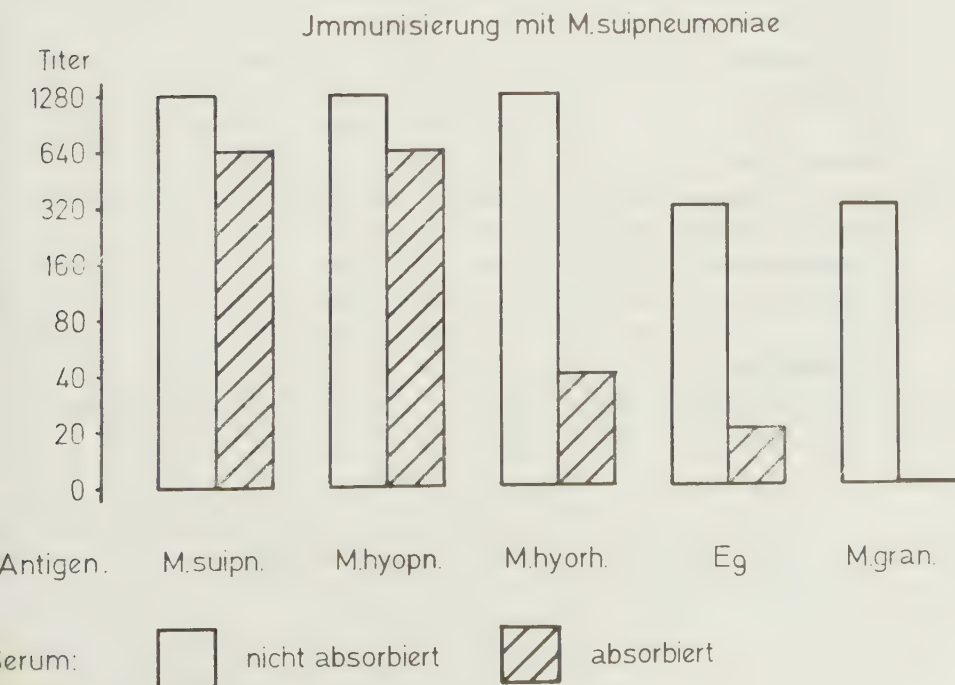


Tabelle 1

Immunisierung mit M.suipneumoniae (Kan. Nr. 7) - Latexagglutination
mit nicht absorbierten Seren:

Zeit- punkt	Antigen	Serumverdünnungsstufe							
		20	40	80	160	320	640	1280	2560
nach 1. Impfg.	M.suipneumoniae	+++	+++	++	+	-	-	-	-
	M.hyopneumoniae	+++	+++	++	+	-	-	-	-
	M.hyorhinitis	+++	+++	++	+	-	-	-	-
	E ₉	++	-	-	-	-	-	-	-
	M.granularum	-	-	-	-	-	-	-	-
nach 2. Impfg.	M.suipneumoniae	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
	M.hyopneumoniae	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
	M.hyorhinitis	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
	E ₉	++	++	+	-	-	-	-	-
	M.granularum	-	-	-	-	-	-	-	-
nach 3. Impfg.	M.suipneumoniae	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	M.hyopneumoniae	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	M.hyorhinitis	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	E ₉	++	++	++	++	+	-	-	-
	M.granularum	+	-	-	-	-	-	-	-
nach 4. Impfg.	M.suipneumoniae	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
	M.hyopneumoniae	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
	M.hyorhinitis	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	E ₉	++	++	++	++	++	-	-	-
	M.granularum	+	+	+	+	+	-	-	-

Tabelle 2

Immunisierung mit M.suipneumoniae (Kan. Nr. 7) - Latexagglutination
nach 4. Impfung mit absorbiertem Serum:

Antigen	Serumverdünnungsstufe						
	20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	+++	+++	+++	+++	++	+	-
M.hyopneumoniae	+++	+++	+++	+++	++	+	-
M.hyorhinae	++	+	-	-	-	-	-
E ₉	+	-	-	-	-	-	-
M.granularum	-	-	-	-	-	-	-

3.2.2 Antiserum gegen M.hypopneumoniae (Kaninchen Nr. 3 und 4):

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tab. 3-6 und der Abb. 6 aufgeführt.

Bei der Untersuchung der präimmunisierten Seren der Kaninchen 3 und 4 konnten mit keinem der Mykoplasmenantigene Agglutinationen beobachtet werden.

a) Nicht absorbierte Seren:

Gegen das homologe Antigen (M.hypopneumoniae) waren schon nach der 2. Impfung deutliche Agglutinationstiter von 1:160 bzw. 1:320 vorhanden. Nach der 3. Impfung erhöhte sich der Titer bei den Kaninchen jeweils um eine Stufe, nach der 4. Impfung erreichte er übereinstimmend die gleiche Höhe von 1:1280. Von den heterologen Antigenen reagierte das M.suipneumoniae-Antigen, was Titerhöhen und Stärke der Agglutinationen anbelangte, identisch mit dem homologen Antigen. Es wiederholte sich damit das bereits mit dem M.suipneumoniae-Antiserum erzielte Ergebnis. Mit M.hyorhinae-Antigen konnten nach der 2. Impfung bei Kan.Nr. 3 ein Titer von 1:160 und bei Kaninchen Nr. 4 ein Titer von 320 ermittelt werden. Bis nach der 4. Impfung erhöhte sich der Titer bei beiden Kaninchen auf 1:640.

Das E₉-Antigen reagierte mit den Seren beider Kaninchen nahezu gleich wie das M.hyorhinae-Antigen. Nach 4 und 10 Wochen wurden die gleichen Titerstufen erreicht, nur waren die Agglutinationen nicht ganz so ausgeprägt.

Das M.granularum-Antigen ergab nach der 2., 3. und 4. Impfung langsam bis auf 1:320 bzw. 1:640 ansteigende Titer mit beiden Kaninchenantisera. Die Reaktionen blieben aber, und zwar auch im unteren Verdünnungsbereich, stets auffallend schwach (+) und weniger ausgeprägt als mit den anderen Antigenen.

b) Absorbiertes Serum:

Aus Tabelle 6 geht hervor, daß die Titer von M.hypopneumoniae und M.suipneumoniae mit den Seren der Kaninchen Nr. 3 und 4 übereinstimmend nach der Absorption um zwei Verdünnungsstufen von 1:1280 auf 1:320 zurückgingen. Die Endtiter lagen dabei aber noch 2 bzw. 3 Stufen höher als die Endpunkte der kreuzreagierenden M.hyorhinae- bzw. E₉-Antigene.

Die schwachen (+) Kreuzagglutinationen mit dem *M.granularum*-Antigen konnten durch die Absorption vollkommen zum Verschwinden gebracht werden.

Auch diese Befunde bestätigen somit die enge antigene Verwandtschaft des *M.hypopneumoniae*- und *M.suipneumoniae*-Antigens, die sich in ihrer Spezifität deutlich von den anderen Mykoplasmen-Antigenen unterscheiden (vgl. Abb. 5 und 6).

Abb. 6: Mittelwerte der Endtiter nach der 4. Immunisierung

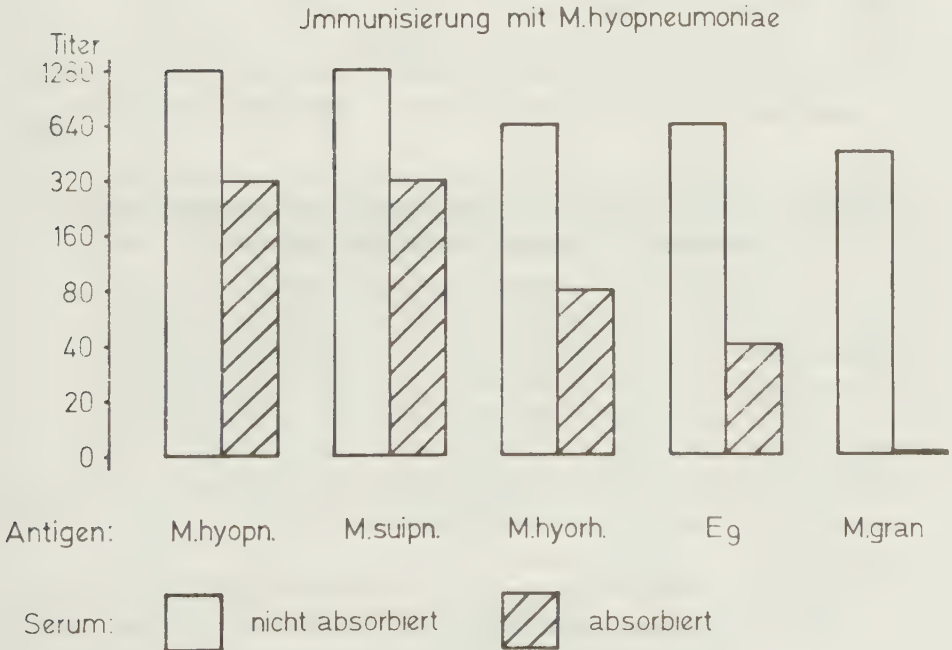


Tabelle 5: Immunisierung mit M.hyopneumoniae-Latexagglutination
nach der 4. Impfung (nicht absorbiertes Serum)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe							
		20	40	80	160	320	640	1280	2560
M.suipneumoniae	3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
	4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
M.hyopneumoniae	3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
M.hyorhinitis	3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
E ₉	3	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
	4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
M.granularum	3	+	+	+	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	-	-

Tabelle 6: Immunisierung mit M.hyopneumoniae-Latexagglutination
nach der 4. Impfung (absorbiertes Serum)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	3	+++	+++	+++	+++	+	-	-
	4	+++	+++	+++	+++	++	-	-
M.hyopneumoniae	3	+++	+++	+++	+++	+	-	-
	4	+++	+++	+++	+++	++	-	-
M.hyorhinitis	3	+++	+++	+	-	-	-	-
	4	+++	+++	+	-	-	-	-
E ₉	3	++	+	-	-	-	-	-
	4	++	+	-	-	-	-	-
M.granularum	3	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-

3.2.3 Antiserum gegen M.hyorhynis (Kaninchen Nr. 1 und 2):

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tab. 7-11 und der Abb. 7 zusammengefaßt.

Die Untersuchungen der präimmunisierten Seren der Kaninchen 1 und 2 ergaben, daß beide Seren mit den Antigenen von M.hyorhynis, M.hyopneumoniae und M.suipneumoniae schwach positive Titer von 1:80 aufwiesen. Dagegen reagierten die Antigene E₉ und M.granularum stets negativ.

a) Nicht absorbierte Seren:

Mit dem homologen M.hyorhynis-Antigen konnten schon nach der 2. Impfung in beiden Kaninchenserum positive Reaktionen bis zu einer Serumverdünnung von 1:640 festgestellt werden. Durch die 3. und 4. Immunisierung erhöhten sich die Titer beider Seren noch um eine weitere Stufe auf 1:1280.

Die heterologen M.suipneumoniae- und M.hyopneumoniae-Antigene zeigten auch bei diesen Kaninchenantisera übereinstimmende Werte. Nach einem Anfangstiter von 1:320 nach der 2. Impfung konnten durch die beiden folgenden Impfungen die Werte beider Antigene um jeweils eine Verdünnungsstufe erhöht werden und erzielten damit ebenfalls einen Endtiter von 1:1280. Das E₉-Antigen wies nach der 2. Impfung in beiden Seren einen Agglutinationstiter von 1:80 auf, der übereinstimmend nach der 2. Impfung auf 1:320 und nach der letzten Impfung auf 1:640 anstieg. Die Reaktionen des M.granularum-Antigens ergaben mit diesen Kaninchenantisera durchweg nur + Werte.

Die Agglutinationstiter begannen nach der 2. Impfung mit Werten um 1:20 bzw. 1:40 und erreichten nach leicht differierenden Zwischentitern denselben Endwert von 1:320.

b) Absorbiertes Serum:

Wie aus Tabelle 11 zu entnehmen ist, gingen zwar auch die Titer des homologen Antigens M.hyorhynis um zwei Verdünnungs-

stufen zurück, unterschieden sich aber jetzt um zwei bzw. drei Stufen von den Werten der Stämme *M.suipneumoniae* und *M.hypopneumoniae*.

Die Kreuzagglutinationen mit dem E_g -Antigen blieben auch nach Absorption der Seren bestehen.

Die Ergebnisse von *M.granularum* waren nach der Absorption wieder alle eindeutig negativ (vgl. Abb. 7).

Abb. 7: Mittelwerte der Endtiter nach
der 4. Immunisierung

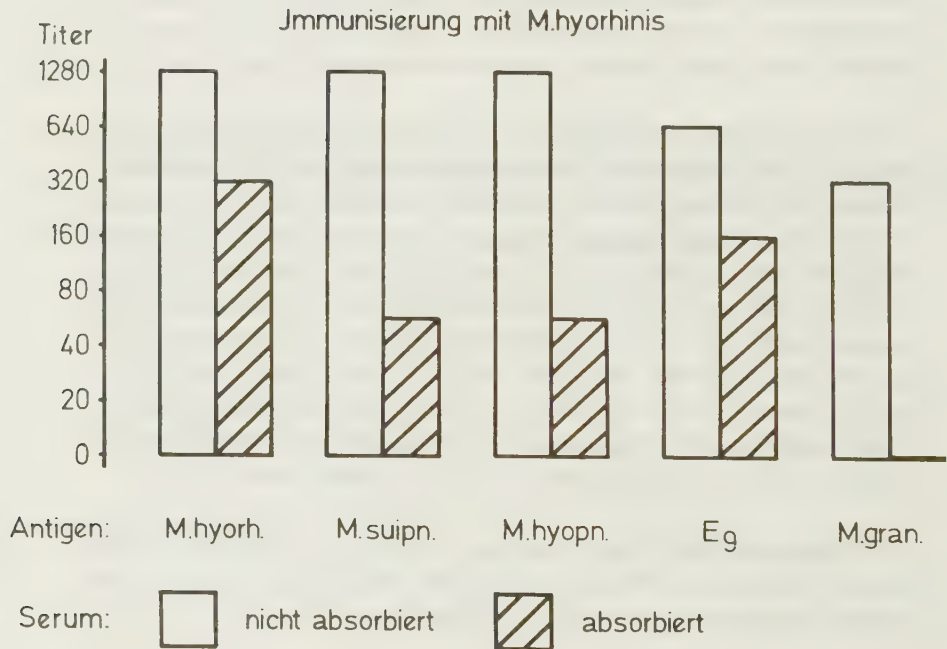


Tabelle 7: Latexagglutination der Seren von Kaninchen Nr. 1 und 2 vor Beginn der Immunisierung

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe				
		20	40	80	160	320
M.suipneumoniae	1	++	+	+	-	-
	2	++	+	-	-	-
M.hyopneumoniae	1	++	+	-	-	-
	2	++	+	-	-	-
M.hyorhinitis	1	++	++	+	-	-
	2	++	+	+	-	-
E ₉	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
M.granularum	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-

Tabelle 8: Immunisierung mit M.hyorhinitis (Kan.Nr. 1 und 2)-
Latexagglutination nach der 2. Impfung
(nicht absorbierte Seren)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	1	+++	+++	+++	++	+	-	-
	2	+++	+++	+++	++	+	-	-
M.hyopneumoniae	1	+++	+++	+++	++	++	-	-
	2	+++	+++	+++	++	+	-	-
M.hyorhinitis	1	+++	+++	+++	+++	++	+	-
	2	+++	+++	+++	+++	++	+	-
E ₉	1	+++	+++	++	-	-	-	-
	2	+++	+++	++	-	-	-	-
M.granularum	1	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-

Tabelle 9: Immunisierung mit M.hyorhinitis (Kan.Nr. 1 und 2)-
Latexagglutination nach der 3. Impfung
(nicht absorbierte Seren)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	1	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
M.hyopneumoniae	1	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	2	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
M.hyorhinitis	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
E ₉	1	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	2	+++	+++	+++	+++	++	-	-
M.granularum	1	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-

Tabelle 10: Immunisierung mit M.hyorhinitis (Kan.Nr. 1 und 2)-
Latexagglutination nach der 4. Impfung
(nicht absorbierte Seren)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe							
		20	40	80	160	320	640	1280	2560
M.suipneumoniae	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
M.hyopneumoniae	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
M.hyorhinitis	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
E ₉	1	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	2	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
M.granularum	1	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-

Tabelle 11: Immunisierung mit M.hyorhinitis (Kan.Nr. 1 und 2)-
Latexagglutination nach der 4. Impfung
(absorbiertes Serum)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	1	++	+	-	-	-	-	-
	2	+++	+++	++	-	-	-	-
M.hyopneumoniae	1	++	+	-	-	-	-	-
	2	+++	+++	+++	-	-	-	-
M.hyorhinitis	1	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	2	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
E ₉	1	+++	+++	++	+	-	-	-
	2	+++	+++	+++	+	-	-	-
M.granularum	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-

3.2.4 Antiserum gegen E₉ (Kaninchen Nr. 5 und 6):

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 12-16 und der Abb. 8 zusammengefaßt.

Die Seren der Kaninchen 5 und 6 wiesen bereits vor Beginn der Immunisierung, wie in Tab. 12 zu ersehen ist, gegen das M.hyorhins-Antigen sowie gegen die Antigene M.suipneumoniae und M.hypopneumoniae + bzw. ++ Reaktionen in den niedrigen Serumverdünnungen auf. Bei den anderen Stämmen konnten keine präimmun Agglutinationen im Latextest beobachtet werden.

a) Nicht absorbierte Seren

Das homologe E₉-Antigen zeigte nach der 2. Immunisierung einen Agglutinationstiter von 1:80 bzw. 1:160. Nach der 3. Impfung wurde noch ein weiterer Anstieg auf 1:320 ermittelt, während die letzte Impfung keine Titererhöhung mehr erbrachte.

Die Agglutinationen mit den heterologen M.suipneumoniae- und M.hypopneumoniae-Antigene lieferten wieder gleiche Ergebnisse. Die nach der 2. Impfung erhaltenen Titer lagen bei 1:80, erhöhten sich dann nach der 3. Impfung auf 1:320 wie beim homologen Antigen und änderten sich durch die letzte Impfung nicht mehr.

Gegen das M.hyorhins-Antigen waren im Verlaufe der Immunisierung Titer aufgetreten, die denen des homologen E₉-Antigens, was Höhe und Grad anbetraf, fast entsprachen. Die Endtiter nach der 4. Impfung zeichneten sich sogar noch durch stärkere Reaktionen aus. Für M.granularum wurden erst nach der 3. Impfung schwache Agglutinationen bis zur Serumverdünnung 1:40 festgestellt. Dieser Titer verstärkte sich noch nach der letzten Impfung etwas, wo das eine Serum bis zur Verdünnung 1:80 ++ reagierte, während im anderen schwache (+) Agglutinationen bis 1:160 zu beobachten waren.

b) Absorbiertes Serum:

Das Serum von Kaninchen Nr. 6 gelangte nicht zur Absorption, da es beim Zentrifugieren verunreinigt wurde. So konnten nur die Werte von Kaninchen Nr. 5 ermittelt werden.

Aus Tab. 16 sowie Abb. 8 geht hervor, daß nur die Agglutinationstiter gegen das homologe E_g -Antigen und das heterologe *M.hyorh*-Antigen in gleicher Höhe bestehen blieben. Die Kreuzagglutinationen mit den drei anderen Stämmen ließen sich durch die Absorption zum Verschwinden bringen.

Abb. 8: Mittelwerte der Endtiter nach
der 4. Immunisierung

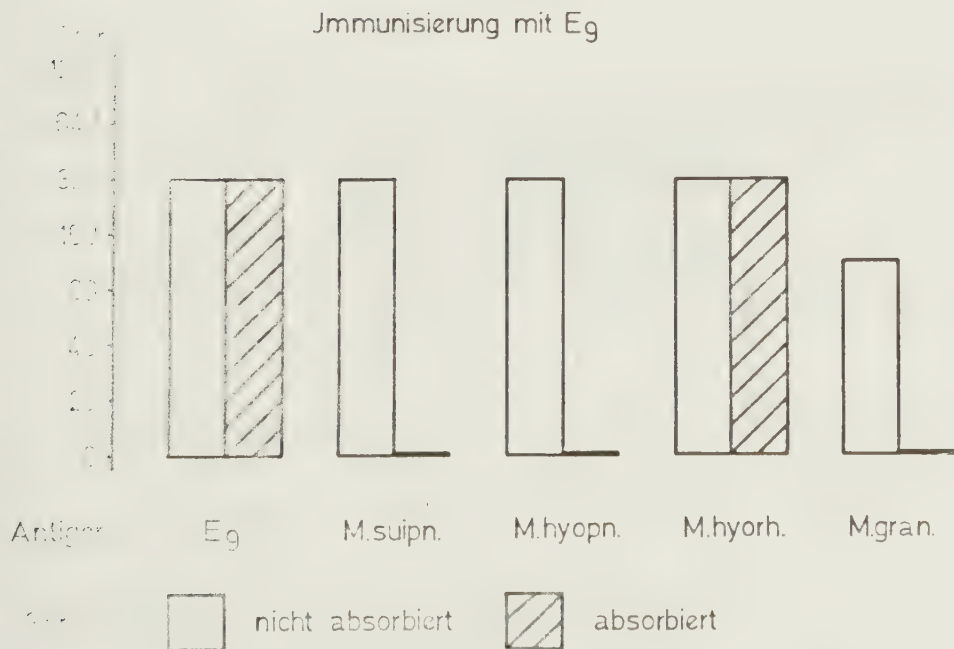


Tabelle 12: Latexagglutination der Seren von Kaninchen Nr. 5 und 6 vor Beginn der Immunisierung

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe				
		20	40	80	160	320
M.suipneumoniae	5	+	+	-	-	-
	6	++	+	-	-	-
M.hypopneumoniae	5	++	+	-	-	-
	6	+	+	-	-	-
M.hyorhinitis	5	++	++	++	-	-
	6	++	++	++	-	-
E ₉	5	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
M.granularum	5	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-

Tabelle 13: Immunisierung mit E₉ (Kan. Nr. 5 und 6)-
Latexagglutination nach der 2. Impfung
(nicht absorb. Serum)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	5	++	+	+	-	-	-	-
	6	+++	+++	++	-	-	-	-
M.hypopneumoniae	5	++	++	+	-	-	-	-
	6	+++	+++	++	+	-	-	-
M.hyorhinitis	5	+++	+++	++	-	-	-	-
	6	+++	+++	+++	++	-	-	-
E ₉	5	+++	+++	++	-	-	-	-
	6	+++	+++	+++	+	-	-	-
M.granularum	5	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 14: Immunisierung mit E₉ (Kan. Nr. 5 und 6)
Latexagglutination nach der 3. Impfung
(nicht absorbiertes Serum)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	5	+++	+++	+++	++	+	-	-
	6	+++	+++	+++	+++	++	-	-
M.hypopneumoniae	5	+++	+++	+++	++	+	-	-
	6	+++	+++	+++	+++	++	-	-
M.hyorhinis	5	+++	+++	+++	+	-	-	-
	6	+++	+++	+++	+++	+	-	-
E ₉	5	+++	+++	+++	+++	+	-	-
	6	+++	+++	+++	+++	+	-	-
M.granularum	5	+	+	-	-	-	-	-
	6	+	+	-	-	-	-	-

Tabelle 15: Immunisierung mit E₉ (Kan. Nr. 5 und 6)
Latexagglutination nach der 4. Impfung
(nicht absorbiertes Serum)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	5	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	6	+++	+++	+++	+++	++	-	-
M.hypopneumoniae	5	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	6	+++	+++	+++	+++	+	-	-
M.hyorhinis	5	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	6	+++	+++	+++	+++	++	-	-
E ₉	5	+++	+++	+++	+++	+	-	-
	6	+++	+++	+++	+++	+	-	-
M.granularum	5	+++	+++	++	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	-	-	-

Tabelle 16: Immunisierung mit E₉ (Kan. Nr. 5 und 6)-
Latexagglutination nach der 4. Impfung
(absorbiertes Serum)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	5	-	-	-	-	-	-	-
M.hypopneumoniae	5	-	-	-	-	-	-	-
M.hyorhinae	5	+++	+++	+++	++	+	-	-
E ₉	5	+++	+++	+++	+++	+	-	-
M.granularum	5	-	-	-	-	-	-	-

Das Serum von Kaninchen Nr. 6 konnte nicht absorbiert werden,
da es beim Zentrifugieren verunreinigt wurde.

3.2.5 Antiserum gegen M.granularum (Kaninchen Nr. 9 und 10):

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 17-21 und der Abb. 9 aufgeführt.

Vor Beginn der Immunisierung zeigten die Seren der Kaninchen 9 und 10 gegen die Antigene M.suipneumoniae und M.hypopneumoniae und auch teilweise gegen das M.hyorhinis-Antigen in den niedrigen Serumverdünnungen, wie in Tab. 17 zu sehen ist, bereits positive Reaktionen.

a) Nicht absorbierte Seren:

Mit dem homologen M.granularum-Antigen wurden keine sehr hohen Agglutinationstiter erhalten. Nach der 2. Impfung traten Werte von 1:80 bzw. 1:160 auf, die durch die folgenden Impfungen nur noch um eine Verdünnungsstufe erhöht bzw. in der Reaktionsstärke verändert wurden.

Die Titer der heterologen M.suipneumoniae- und M.hypopneumoniae-Antigene unterschieden sich nach der 2. und 3. Impfung kaum von denen des homologen Antigens. Nach der letzten Impfung trat aber hier noch eine weitere Titererhöhung auf 1:320 ein, wobei die Reaktionen allerdings überwiegend als schwach (+) zu beurteilen waren. Auch das heterologe M.hyorhinis-Antigen kreuzagglutinierte stark mit dem M.granularum-Antiserum. Es lag nach der 4. Impfung nur 1 Stufe unter dem Endtiter des homologen Antigens.

Die Titer gegen das E₉-Antigen verhielten sich sehr ähnlich. Sie waren nach der 2. Impfung bereits vorhanden und blieben nur ca. 1 bis maximal 2 Stufen unter dem Titer des homologen Antigens.

b) Absorbiertes Serum:

Tabelle 21 und Abb. 9 zeigen, daß die Agglutinationstiter gegen das homologe Antigen durch die Absorption nicht verändert wurden.

Auffallenderweise blieben auch die Werte des heterologen Stammes E_g erhalten, während die restlichen Antigene nur noch zum Teil in der niedrigsten Serumverdünnung schwache Reaktionen aufwiesen.

Abb. 9: Mittelwerte der Endtiter
nach der 4. Immunisierung

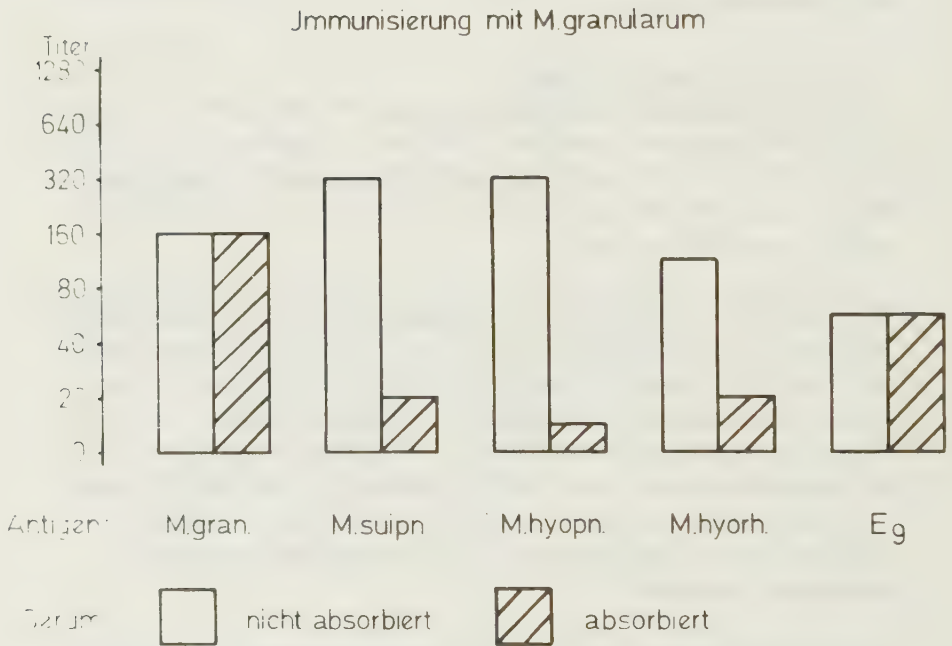


Tabelle 17: Latexagglutination der Seren von Kaninchen Nr. 9 und 10 vor Beginn der Immunisierung

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe				
		20	40	80	160	320
M.suipneumoniae	9	++	+	-	-	-
	10	+	+	-	-	-
M.hyopneumoniae	9	++	+	-	-	-
	10	++	+	+	-	-
M.hyorhinis	9	+	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
E ₉	9	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
M.granularum	9	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-

Tabelle 18: Immunisierung mit M.granularum (Kan.Nr. 9 u. 10):
Latexagglutination nach der 2. Impfung
(nicht absorbiertes Serum)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	9	++	++	++	+	-	-	-
	10	++	++	++	+	-	-	-
M.hypopneumoniae	9	++	++	++	-	-	-	-
	10	++	++	++	+	-	-	-
M.hyorhinitis	9	++	++	+	-	-	-	-
	10	++	++	++	-	-	-	-
E ₉	9	++	+	-	-	-	-	-
	10	++	++	+	-	-	-	-
M.granularum	9	+++	+++	+	-	-	-	-
	10	+++	+++	+++	+	-	-	-

Tabelle 19: Immunisierung mit M.granularum (Kan.Nr. 9 u. 10)
Latexagglutination nach der 3. Impfung
(nicht absorbiertes Serum)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	9	++	++	++	+	-	-	-
	10	++	++	++	+	-	-	-
M.hypopneumoniae	9	+++	++	++	+	-	-	-
	10	+++	+++	++	+	-	-	-
M.hyorhinitis	9	+++	++	++	+	-	-	-
	10	++	++	++	+	-	-	-
E ₉	9	+++	++	+	-	-	-	-
	10	+++	+++	++	+	-	-	-
M.granularum	9	+++	+++	+++	+	-	-	-
	10	+++	+++	+++	++	-	-	-

Tabelle 20: Immunisierung mit M.granularum (Kan.Nr. 9 u. 10)-
Latexagglutination nach der 4. Impfung
(nicht absorbiertes Serum)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	9	++	++	++	+	+	-	-
	10	++	++	++	+	+	-	-
M.hyopneumoniae	9	++	++	++	+	+	-	-
	10	+++	+++	++	+	+	-	-
M.hyorhinis	9	++	++	+	-	-	-	-
	10	+++	+++	++	+	-	-	-
E ₉	9	++	+	-	-	-	-	-
	10	+++	+++	++	-	-	-	-
M.granularum	9	+++	+++	+++	+	-	-	-
	10	+++	+++	+++	+++	-	-	-

Tabelle 21: Immunisierung mit M.granularum (Kan.Nr. 9 u. 10)-
Latexagglutination nach der 4. Impfung
(absorbiertes Serum)

Antigen	Kan. Nr.	Serumverdünnungsstufe						
		20	40	80	160	320	640	1280
M.suipneumoniae	9	+	-	-	-	-	-	-
	10	+	+	+	+	+	+	+
M.hyopneumoniae	9	+	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
M.hyorhinis	9	+	-	-	-	-	-	-
	10	+	-	-	-	-	-	-
E ₉	9	++	+	-	-	-	-	-
	10	++	++	+	-	-	-	-
M.granularum	9	+++	+++	+++	+	-	-	-
	10	+++	+++	+++	++	-	-	-

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Latexagglutination als serologische Methode zur Identifizierung von Schweinemykoplasmen und zum Nachweis von Antikörpern eignet. Die Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an die Arbeit von MORTON (1966) über die Latexagglutinationsreaktion mit Mykoplasmenstämmen, die in der Humanmedizin von Bedeutung sind.

Die Agglutination und besonders die Form der passiven Agglutination, zu der auch die Latexagglutination zu zählen ist, zeichnet sich gegenüber der Präzipitation durch ihren erheblich höheren Empfindlichkeitsgrad aus (MORTON, 1966). Mit kleinsten Mengen an Antigen lassen sich noch bei mehr als tausendfacher Verdünnung des Serums Antikörper durch Agglutinationsreaktionen nachweisen. Dagegen sind Präzipitationsreaktionen in flüssigen Medien oder Gels bei mehr als 10-50-facher Verdünnung der Antiseren schon nicht mehr zu erkennen. Bei der passiven Agglutination wird schließlich diese hohe Empfindlichkeit nochmals verstärkt, da sich die geringen Antigenmengen an die Oberfläche des relativ voluminösen Trägerpartikels ringsum anlagern und somit die Reaktionsfläche der multivalenten Antigene erheblich vergrößert wird. Von großer Bedeutung für den Ablauf der Agglutinationsreaktion ist die Ionenkonzentration des umgebenden Mediums. Die negativ geladene Oberfläche der Antigene muß durch Zugabe von Salzen zuerst adäquat gedämpft werden, bevor sich andere Zellen oder Moleküle an diese annähern können, so daß dann spezifische Brücken zwischen den Bindungsstellen der multivalenten Antigene und denen der bivalenten Antikörper zustande kommen können. Daher wurde auch in dieser Arbeit der relativ stabile Boratpuffer dem von MORTON angegebenen Glycinpuffer vorgezogen.

In bisherigen Arbeiten über Schweinemykoplasmen waren nur ungenügende Angaben über geeignete Immunisierungsverfahren

zu finden, mit denen bei Kaninchen ausreichend hohe Titer von Antikörpern im Serum zu gewinnen sind. MORTON und ROBERTS (1967) dagegen berichten ausführlich über Untersuchungen mit verschiedenen Immunisierungsverfahren an Kaninchen, bei denen mehrere Mykoplasmenstämme aus dem Humanmedizinischen Bereich verwendet wurden. Bei diesen Untersuchungen hatte es sich erwiesen, daß schon eine erste, simultane Impfung an mehreren Körperstellen (um damit sofort verschiedene Lymphzentren anzuregen) unter Verwendung von kompletten Freund'schem Adjuvans schon nach relativ kurzer Zeit (im Vergleich zu sonst üblichen Immunisierungsverfahren) zu beachtlichen Titerhöhen führte. Daher lag es nahe, dieses Immunisierungsverfahren auch mit den hier untersuchten Schweinemykoplasmenstämmen zu versuchen. Die hiermit erhaltenen Titer lagen zwar nach der ersten Impfung nicht so hoch wie in der oben angeführten Arbeit, doch übertrafen sie zumindest die Werte, die mit anderen Impfverfahren bei Schweinemykoplasmen nach der entsprechenden Zeit erzielt worden waren. Durch drei weitere Impfungen konnten schließlich bei den Stämmen *M.suipneumoniae*, *M.hypopneumoniae* und *M.hyorhinis* Titer über 1000 erreicht werden. Dagegen blieben die Titer der Stämme *E₉* und *M.granularum* insgesamt niedriger. Da immer zwei Kaninchen parallel unter gleichen Bedingungen und mit demselben Stamm immunisiert worden waren, dürften die niedrigeren Werte, die bei der Immunisierung mit diesen zwei Stämmen erhalten wurden, sicherlich nicht auf abweichende Immunreaktionen der vier betreffenden Kaninchen zurückzuführen sein. Andererseits konnte bei der Anzüchtung aber beobachtet werden, daß gerade mit den Stämmen *E₉* und *M.granularum* im Vergleich zu den drei anderen untersuchten Stämmen nach relativ kurzer Bebrütungsdauer aus gleichen Volumina flüssigen Nährmediums erheblich größere Mengen an Antigen gewonnen werden konnten. Also unterschieden sich die Stämme *E₉* und *M.granularum* zugleich in zwei Eigenschaften von den drei anderen Stämmen, nämlich erstens in ihrer schwächeren immunogenen Wirkung und zweitens in ihrer stärkeren Vermehrungsfähigkeit. Worauf diese beiden Eigenschaften beruhen und ob sie möglicherweise zusammenhängen, ist ungeklärt. Wahr-

scheinlich bestehen Beziehungen zwischen Zellmembranstrukturen dieser Mykoplasmen.

Die Ausführungstechnik des Latextestes konnte im Vergleich mit der Arbeit von MORTON (1966) erheblich vereinfacht werden. Durch die Verwendung des stabilen Boratpuffers war das Rinderserumalbumin nicht mehr nötig. Bei vergleichenden Untersuchungen hatte sich die Bebrütung in einem feuchtigkeitsgesättigten Raum bei 37 °C gegenüber einem Wasserbad von 42 °C als besser erwiesen. Die feuchtigkeitsgesättigte Luft war insofern notwendig, da trotz der Abdeckung der Röhrchen sonst zuviel Wasser während der Bebrütung verdunstete. Wenn die Röhrchen ohne größeres Schütteln aus dem Brutschrank herausgenommen wurden und noch eine Stunde bei Zimmertemperatur stehenblieben, konnte der Test danach ohne Schwierigkeiten abgelesen werden, und ein Zentrifugieren war nicht mehr nötig.

Bei den Versuchen mit den nicht absorbierten Seren im Latextest konnte bei allen Antiseren im Verlauf der Immunisierungsperiode ein deutlicher Anstieg der Agglutinationstiter beobachtet werden. Auffallenderweise wiesen die einzelnen Antigene bis auf *M. granularum* fast immer gleiche Titerhöhen in der Reaktion mit den verschiedenen Antiseren auf oder differierten höchstens um eine Serumverdünnungsstufe. Infolge dieser starken Kreuzagglutinationen ließen sich die einzelnen Mykoplasmenstämme zunächst nicht oder kaum voneinander unterscheiden.

In ihrer Arbeit "Immunological Analysis of Mycoplasma Membranes" konnten KAHANE und RAZIN (1969) bei *M. laidlawii* und *M. gallisepticum* zeigen, daß die antigenen Determinanten der Mykoplasmen in der Zellmembran lokalisiert sind. Diese Zellmembran der Mykoplasmen setzt sich, wie RAZIN (1967) an anderer Stelle berichtet, wahrscheinlich aus Lipidprotein-Untereinheiten zusammen. RAZIN konnte ferner nachweisen, daß die Lipidzusammensetzung der Membran von entsprechenden

Komponenten des verwendeten Nährmediums abhängig ist und Morphologie sowie osmotische Resistenz der Zellmembranen durch variierende Zusammensetzung der Lipide des Nährmediums verändert werden können. Die 5 von mir untersuchten Mykoplasmastämme sind alle in einem Serum-enthaltenden Nährmedium angezüchtet worden. Die Annahme lag nahe, daß die dadurch bedingten, ähnlichen Komponenten der Membranen oder aber auch Verunreinigungen des Antigens mit noch anhaftenden Nährbodenbestandteilen bei den immunisierten Kaninchen aller Gruppen zur Bildung von gegen diese Nährmediumkomponenten gerichteten Antikörpern geführt und dann im Latextest unspezifische Kreuzreaktionen ausgelöst hatten. Um solche, durch das Nährmedium verursachten unspezifischen Reaktionen auszuschalten, wurde das nach der letzten Immunisierung durch Entbluten gewonnene Antiserum vor der Agglutination mit lyophilisiertem Nährmedium absorbiert, mit dem Ziel, die gegen die Komponenten des Nährmediums gerichteten Antikörper abzufangen. Die Ergebnisse bestätigen diese Annahme. Die absorbierten Seren zeigten weit geringere Kreuzagglutinationen und die einzelnen Antigene waren in ihrer Reaktion mit den Antiseren besser zu unterscheiden. Erst durch die Absorption der Antiseren mit Nährmedium konnte somit eine befriedigende Spezifität des Latextestes erreicht werden.

Wie GOODWIN et al. (1967) berichten, waren die Stämme *M. suis pneumoniae* und *M. hyopneumoniae* sowohl im Wachstums- als auch im Stoffwechselhemmungstest nicht zu unterscheiden. Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen in der Latexagglutination zeigten diese beiden Stämme sowohl vor wie auch nach der Absorption der Seren bei den einzelnen Kaninchen übereinstimmende serologische Befunde. Damit liegt der Schluß nahe, daß diese Stämme entweder identisch sind oder zumindest eine sehr enge serologische Verwandtschaft zwischen ihnen besteht. Beide Stämme unterschieden sich auch deutlich von den anderen Mykoplasma-Antigenen. Schwache Kreuzreaktionen zwischen den Stämmen *M. suis pneumoniae* und

M.hypopneumoniae einerseits und M.hyorhinis andererseits sind allerdings aufgetreten. Ähnliche Beobachtungen sind auch von GOODWIN und HODGSON (1970) bei Untersuchungen derselben Stämme in der Passiven Hämagglutination gemacht worden.

Gewisse Antigenbeziehungen bestehen möglicherweise auch zwischen der Spezies M.hyorhinis und dem Stamm E₉. Die kreuzweisen Reaktionen ihrer Antigene und Antiseren blieben nach der Absorption bestehen und waren deutlich stärker als zwischen diesen beiden Mykoplasmen und M.suipneumoniae bzw. M.hypopneumoniae. Auffallend war, daß der Stamm E₉ auch gegen das M.granularum-Antiserum nach der Absorption noch mit einem Titer von 1:80 positiv reagierte, während das Antiserum von E₉ das M.granularum-Antigen eindeutig nicht agglutinierte. Diese widersprüchlichen Ergebnisse mit dem Stamm E₉ lassen sich vielleicht dadurch erklären, daß dieser Mykoplasmenstamm serologisch nicht einheitlich oder ganz rein ist. Aus den Befunden mit M.granularum geht hervor, daß sich diese Spezies serologisch eindeutig von den anderen Mykoplasmenstämmen unterscheidet. Dieses Ergebnis steht in völliger Übereinstimmung zu den Untersuchungen von DINTER, DANIELSSON und BAKOS (1965). Das M.granularum-Antigen zeigte mit keinem der heterologen Mykoplasmen-Antiseren auch nur Spuren einer Kreuzagglutination, sofern die Seren absorbiert waren. Das spricht zweifelsohne für die besondere Antigenspezifität dieser Spezies und damit auch für ihre berechnigte taxonomische Eigenständigkeit.

5. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Gegen 5 Stämme von Schweinemykoplasmen (*M.suipneumoniae*, *M.hypopneumoniae*, *M.hyorhinis*, *M.granularum* und Stamm E₉) wurden durch Immunisierung von Kaninchen unter Verwendung von kompletten Freund'schem Adjuvans Antiseren hergestellt. Diese Antiseren wurden kreuzweise in der Latex-Agglutination gegen die homologen und heterologen Antigene (gewonnen durch Ultraschallbehandlung) getestet.
- 2) *M.hypopneumoniae* und *M.suipneumoniae* ließen sich serologisch nicht unterscheiden. Es traten gleich hohe Endtiter in homologen und heterologen Antiseren auf (Endtiter 1:640 bzw. 1:320). Beide Arten waren aber von den anderen Stämmen eindeutig abtrennbar, wobei nur gegenüber *M.hyorhinis* schwache Kreuzagglutinationen auftraten.
- 3) *M.hyorhinis* zeigte mit dem aus Ferkeln isolierten Stamm E₉ starke Kreuzreaktionen. Die Endtiter zwischen homologen und heterologen Antigenen bzw. Antiseren differierten höchstens um eine Verdünnungsstufe.
- 4) *M.granularum* ließ sich serologisch am deutlichsten von den anderen Mykoplasmen abgrenzen. Das Antigen reagierte weder mit den heterologen Antiseren noch traten bei Verwendung von *M.granularum*-Antiseren (homologer Titer 1:160) nennenswerte Reaktionen der anderen Mykoplasmenantigene auf.
- 5) Zur serologischen Differenzierung der Mykoplasmen eignete sich nur Antiserum, das zur Ausschaltung unspezifischer Reaktionen vorher mit lyophilisiertem Nährmedium absorbiert worden war. Unter diesen Voraussetzungen eignete sich der Latextest aber gut zur Identifizierung der untersuchten Stämme.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ACKERMANN, J. P. W. M. und
W. K. W. HILL: Complement Fixation Test
in the Diagnosis of
Enzootic Pneumoniae in Pigs.
Neth.J.vet.Sci. 5, 53-59 (1972)
2. DAVIS, B. D.,
R. DULBECCO, H. N. EISEN,
H. S. GINSBERG und
W. B. WOOD Microbiology
Hoeber Medical Division,
New York 1968
3. DINTER, Z.,
D. DANIELSSON und
K. BAKOS Differentiation of Porcine
Mycoplasma Strains
J. gen. Microbiol. 41,
77-84 (1965)
4. FUJIKURA, T.,
S. NAMIOKA und
S. SHIBATA Tube Agglutination Test of
Mycoplasma hyopneumoniae
Infection of Swine.
Nat.Inst.Anim.Hlth.Quart.
(Tokyo) 10, 42-43 (1970)
5. GOODWIN, R. F. W. und
R. G. HODGSON The passive hemagglutination
test for the detection of
Mycoplasma suis pneumoniae and
the possible diagnosis of
enzootic pneumonia of pigs.
J.Hyg.Camb. 68, 327-336 (1970)
6. GOODWIN, R. F. W.,
A. P. POMEROY und
P. WHITTLESTONE Characterisation of Mycoplasma
suis pneumoniae: a mycoplasma
causing enzootic pneumonia
of pigs.
J.Hyg.Camb. 65, 85-96 (1967)

7. GOODWIN, R. F. W. und
P. WHITTLESTONE

Production of enzootic pneumonia in pigs with a micro-organism grown in media free from livings cells.

Vet.Rec. 76, 611 (1964)
8. HERDERSCHEE, D.

An improved medium for the cultivation of the Eaton agent.

Antonie van Leeuwenhoek 29, 154 (1963)
9. HODGES, R. T. und
A. O. BETTS

Diagnosis of Enzootic Pneumonia of Pigs. I. Experimental Studies. II. Field Studies.

Vet.Rec. 85, 454-458 (1969)
10. JAIN, N. C.,
D. E. JASPERS und
J. D. DELLINGER

Cultural characters and serological Relationship of some Mycoplasma isolated from bovine Sources.

J.gen.Microbiol. 49, 401-410 (1967)
11. KABAT, E. A., und
M. M. MAYER

Latex Fixation Test

Experimental Immunochemistry, Chapt. 3, 124 (1961)
12. KAHANE, J. und
S. RAZIN

Immunological Analysis of Mycoplasma Membranes.

J.Bact. 100, 187-194 (1969)
13. L'ECUYER, C. und
BOULANGER, P.

Enzootic Pneumonia of Pigs: Identification of a Causative Mycoplasma in Infected Pigs and in Cultures by Immunofluorescent Staining.

Can.J.comp.Med., 34, 38-46 (1970)

14. LAM, K. M. und
W. P. SWITZER
Mycoplasmal Pneumonia of Swine:
Development of an Indirect
Hemagglutination Test.
Am.J.Vet.Res. 32, 1731-1736
(1971)
15. LYNN, R. J.
The immune response of rabbits
to various strains of mycoplasma.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 143, 654-663
(1967)
16. MORTON, H. E.
Mycoplasma-Latex Agglutination
Reaction
J.Bact. 92, 1196-1205 (1966)
17. MORTON, H. E. und
R. J. ROBERTS
Production of Anti-Mycoplasma
(PPL0) Antibodies in Rabbits.
Proc.soc.exp.biol.med. 125,
538-543 (1967)
18. RAZIN, S.
The Cell Membrane of Mycoplas-
mas.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 143, 115-127
(1967)
19. ROBINSON, F. R.,
R. W. MOORE und
H. E. REDMOND
Serologic Response of Swine to
a Mycoplasma: Indirect Hemagglu-
tination Plate Test.
Am.J.Vet.Res. 28, 149-152 (1967)
20. ROSS, R. und
W. P. SWITZER
Comparisons of Isolates of
Mycoplasma hyorhinis by
Indirect Hemagglutination.
Am.J.Vet.Res. 24, 622-627 (1963)

21. SCHIMMEL, D. und
Th. HUBRIG

Zur serologischen Differenzierung von Mykoplasmen des Schweines.
Mh.Vet.Med. 23, 89-92 (1968)

22. TULLY, I. G. und
S. RAZIN

Physiological and Serological Comparisons Among Strains of *Mycoplasma granularum* and *Mycoplasma laidlawii*.
J.Bact. 95, 1504-1512 (1968)

Herrn Prof. Dr. Th. Schliesser danke ich für die Überlassung des Themas sowie seine verständnisvolle Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Institutes und besonders Frau Dr. E. Balke möchte ich herzlich danken für die erhaltene Hilfe und die zahlreichen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 20. März 1947 wurde ich in Frankfurt am Main geboren. Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Grundschule und von 1957 bis 1966 das Altsprachliche Lessing-Gymnasium in Frankfurt, an dem ich im Februar 1966 die Reifeprüfung absolvierte.

Im April 1966 wurde ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität immatrikuliert. Ich blieb während des gesamten Studiums in Gießen und bestand im September 1968 die Tierärztliche Vorprüfung und im November 1971 die Tierärztliche Prüfung.

Die Arbeit an der vorliegenden Dissertation begann ich im Juni 1971 und beendete sie im Januar 1973.

